# 云南桔小实蝇五个地理种群的遗传分化研究

施　伟，叶　辉*
（云南大学生命科学学院生物系，昆明　650091）

**摘要**：对云南省瑞丽、景洪、化念、元江、河口的桔小实蝇5个地理种群共27个个体的线粒体细胞色素氧化酶Ⅰ（COⅠ）基因进行了部分序列测定。序列的碱基变化中转换明显多于颠换、无碱基的插入和缺失。5个地理种群中共有27个多态位点和23种单倍型，其中2种为共享单倍型。桔小实蝇5个地理种群的 Fst 值在0.0364～0.1364之间（$P>0.05$），Nm 值在3.88～13.25之间。对其所有单倍型聚类分析发现，单倍型在系统树中的分布散乱、混杂，没有显示出明显的地理分布族群。分析认为5个地理种群间已存有一定程度的遗传分化，但分化的程度还比较低。造成5个种群这种遗传分化的因素主要与地理隔离有关，而种群间低程度的遗传分化估计与桔小实蝇在云南的发展历史及生态适应有关。

**关键词**：桔小实蝇；地理种群；线粒体 DNA；细胞色素氧化酶Ⅰ基因；遗传分化
**中图分类号**：Q968　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2004)03-0384-05

# Genetic differentiation in five geographic populations of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*（Hendel）（Diptera: Tephritidae）in Yunnan Province

SHI Wei, YE Hui*（Department of Biology, College of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China）

**Abstract**: Partial mitochondrial cytochrome oxidase Ⅰ（COⅠ）region was sequenced from 27 individuals of 5 geographic populations of *Bactrocera dorsalis*（Hendel）from Ruili, Jinghong, Yuanjiang, Huanian and Hekou of Yunnan Province, respectively. Transition was higher than transversion, without insertion and deletion. In total, 23 haplotypes were identified within the sequences, with 27 sites showing polymorphism and 2 haplotypes shared. The Fst values among 5 populations were 0.0364－0.1364（$P>0.05$）and Nm 3.88－13.25. Phylogenetic trees of haplotypes were constructed by N-J method. Haplotypes did not accord with their geography. All results showed that genetic differences existed among 5 populations, but the degree was lower. The main reason of the genetic differentiation among 5 populations should be related to genetic isolation, development history and ecology adaptation of *Bactrocera dorsalis*.

**Key words**: *Bactrocera dorsalis*; geographical population; mtDNA; cytochrome oxidase gene; genetic differentiation

桔小实蝇 *Bactrocera dorsalis* 又名东方果实蝇（oriental fruit fly），广泛分布于印度次大陆、东南亚、夏威夷群岛和环太平洋等热带和亚热带地区（Christenson and Foot, 1960）。由于其幼虫蛀食瓜果果肉而导致果实变质腐烂，对热带、亚热带瓜果造成了严重的危害，被许多国家列为重要的检疫性虫害（Southwood and Comins, 1976）。

云南省地理环境复杂，植被类型多样，是我国桔小实蝇广为分布的主要省份之一。据统计该省受桔小实蝇危害的瓜果达百余种之多，其中包括芒果、番石榴、苹果、梨、桃等重要的经济水果；受害地域涉及云南近三分之二地区的瓜果产区（李红旭等，2000）。如何有效控制该虫的发生与危害，一直是云南瓜果种植及生产中倍受关注的问题。

桔小实蝇在云南的危害与分布呈明显的季节性变化规律。冬春两季，桔小实蝇主要分布在北纬24°以南的地区，这一地区称之为该虫的常年分布区。而夏秋两季，桔小实蝇分布区域向北扩张直至北纬26°的地区，北纬24°与26°之间的地区成为该虫的季节性分布区（Ye, 2000）。因此，阻止桔小实蝇分布区的扩张，控制其种群分布区域，对于从总体上降低桔小实蝇在云南果蔬作物上的危害程度具有重要意义。

昆虫分子系统学是将分子生物学的方法和原理

基金项目：国家自然科学基金项目（30260023）；国家重大基础研究计划“973”项目（2003CB415100）资助项目
作者介绍：施伟，女，1977年生，硕士，助教，从事昆虫分子生态方面的研究，E-mail：shiwei-200@hotmail.com
*通讯作者 Author for correspondence, E-mail：yehui@ynu.edu.cn
收稿日期 Received：2003-11-06；接受日期 Accepted：2004-02-19

引入到昆虫系统学研究中的一门综合性前沿学科，其研究是建立在丰富的核酸序列信息的分析之上，有助于更深入地了解昆虫种群的遗传学关系、分类、进化等(程家安和唐振华，2001)。昆虫线粒体 DNA 具有结构简单、序列组成较保守、母系遗传、平均进化速率比核 DNA 高等特点，是昆虫分子生物学研究中常被选用的基因(Haymer and McInnis，1994)。

利用分子生物学技术研究云南不同地区桔小实蝇种群的遗传学关系，可以探索各地桔小实蝇种群在数量和空间上的内在联系，从而为制定桔小实蝇在云南的区域性控制提供科学依据。基于这样的思路，本研究采用 DNA 测序的手段对云南桔小实蝇周年发生区内，5 个主要危害区的地理种群共 27 个成虫个体，进行了线粒体 DNA COⅠ基因部分序列的测定和分析，以为揭示该虫 5 个地理种群间的内在联系提供分子生物学方面的证据。

# 1　材料和方法

## 1.1　材料来源

供试桔小实蝇采集于 5 个地点，其基本情况详见表 1。每个采样地大约相距 100 km 以上。虫样由两种方法获得，一是收集当地已受桔小实蝇幼虫蛀害的虫果，置于室内培育从中获得羽化成虫。为保证各供试成虫源于不同的母体，每个虫果中仅取一头成虫供试。二是用性诱剂(甲基丁香酚)直接在当地诱捕成虫。虫样均用 95% 的乙醇保存。

## 1.2　总 DNA 提取

桔小实蝇总 DNA 的提取采用 Kambhampati 和 Rai (1991)方法。

## 1.3　PCR 扩增目的片段及序列测定

PCR 扩增的目的片段为 mtDNA COⅠ基因片段中长度为 601 bp 的一段序列。从 NCBI 中找到与桔小实蝇同目昆虫 COⅠ区的同源序列(GenBank 序列号为 AF423102 ~ AF423107，AY053507 ~ AY053512)，通过 Bioedit 软件将同源序列进行排序，找出保守区段，以此为基础设计出引物 P1、P2，其序列长度和在桔小实蝇 mtDNA 中的位置见表 2。引物由上海申友生物技术有限公司合成。

每一样品的扩增体积为 50 μL，其中灭菌四蒸水 $H_2O$，31 μL；10 × Buffer，5 μL；$Mg^{2+}$ (25 mmol/L)，4 μL；dNTP (25 mmol/L)，1.5 μL；两种引物各 4 μL；TagDNA 聚合酶(5 U/μL) 2 U，模板 DNA 2 uL(含 20 ~ 50 ng DNA)。扩增条件共 35 个循环，包括 94℃，20 s；55℃，20 s；72℃，1 min。反应前 94℃，2 min；反应结束 72℃，5 min，4℃保存。PCR 粗产物的纯化及测序委托上海申友生物技术有限公司完成。测序反应均在 ABI100-377 测序仪上进行。

表 1　样品的来源及其它相关信息

Table 1　Data of samples collected

| 采集地 Sites | 海拔(m) Elevation | 纬度和经度 Latitude and longitude | 代号 Code | 虫数 Number of specimens | 寄主 Host plant | 采集日期(年.月) Collection date (Year. Month) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 瑞丽 Ruili | 907 | 24°01′N　97°51′E | R | 6 | 芒果 Mango | 2002. 6 |
| 景洪 Jinghong | 558 | 21°29′N　100°48′E | X | 6 | 芒果 Mango | 2002. 6 |
| 元江 Yuanjiang | 797 | 23°41′N　101°59′E | Y | 5 | 芒果 Mango | 2002. 6 |
| 化念 Huanian | 1 134 | 23°34′N　102°24′E | N | 5 | 芒果 Mango | 2002. 6 |
| 河口 Hekou | 87 | 22°31′N　103°57′E | E | 5 | 芒果 Mango | 2002. 6 |

表 2　桔小实蝇线粒体 DNA COⅠ基因 PCR 和测序引物

Table 2　Primers used for PCR and sequencing of mt DNA of *B. dorsalis*

| 引物 Primers | 序列 Sequences | 位置* Position* |
|---|---|---|
| P1 | 5′- CGTGCCTATTTCACTTCAGC-3′ | 1 – 20 (L) |
| P2 | 5′-CAGCTGGAGGGGTATTTTGA-3′ | 589 – 601 (H) |

* 表示在桔小实蝇线粒体中的位置。L 为轻链序列，H 为重链序列 Referring to fly mtDNA position. L stands for light strand and H for high strand.

## 1.4　数据分析

将经过校对后的序列用 Bioedit 5.0.6 软件排序。序列的分析，包括序列长度和碱基组成、多态位点分析、单倍型的分布与分布频率的确定以及 N-J 法系统进化树的构建用 Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001)软件进行，并用 Boot-strap 1000 检验分子系统进化树各分枝的置信度。各地理种群间的遗传分化水平(Fst)以及基因流的计算，通过 Arlequin 1.1 中的 AMOVA 程序进行。

用桔小实蝇 3 个国外个体以及其 5 个近缘种（*B. ascita*，*B. tuberculata*，*B. latifrons*，*B. correcta*，*B. diversa*）作为云南桔小实蝇 5 个地理种群的对照，从 GenBank 中找到与之对应的线粒体 COⅠ区的序列（GenBank 序列号为 AF423102、AF423103、AF423105、AF423107 和 AF423108）进行比较分析。用 Bioedit 5.0.6 软件进行序列排定，通过 Mega 2.1 软件计算各种群间的 Tamura-Nei 净遗传距离。

# 2 结果

## 2.1 序列特征分析

用引物 P1，P2 扩增得到的 PCR 产物经电泳检测结果未发现特异性条带，空白对照实验也未出现扩增产物，可以排除外源 DNA 污染的可能性。

PCR 产物经纯化、测序，最终得到长度为 534 bp 的序列。在所有的序列中共有 27 个变异位点，占所有碱基数的 5.1%。其中发生转换和颠换的位点个数分别为 22 和 5 个，变异位点中未发现碱基的插入和缺失。碱基的组成中 A + T 的含量均明显高于 G + C 的含量，与双翅目实蝇昆虫线粒体 DNA 的碱基组成一致（Muraji and Nakahara，2001）。

## 2.2 单倍型及其分布格局关系

在所分析的 27 个桔小实蝇个体中共发现 23 种单倍型（GenBank 序列号 AY612303 ~ AY612325），占所有个体数的 81.48%，共享单倍型共 2 种。桔小实蝇 5 个种群都拥有各自独享的单倍型，且独享单倍型所占的比率以及分布频率都比较高，各种群独享单倍型的分布见表 3。独享单倍型的存在表明这些地理种群之间已呈现出一定程度的遗传分化。

从图 1 对单倍型构建的 NJ 分子系统树可见，23 种单倍型在系统聚类树中的分布表现出一种散乱、无规则的分布格局，即单倍型并没有按地理分布形成明显的族群（clade）。这表明各地理种群间的遗传分化程度还比较低。

**表 3 23 种单倍型在桔小实蝇 5 个地理种群中的分布、单倍型多态性（h）和核苷酸多态性（pi）**

**Table 3 The distribution of 23 haplotypes，haplotype diversity（h）and nucleotide diversity（pi）for 5 geographic populations of *B. dorsalis* from Yunnan Province**

| 种群 Population | 序列 Sequence | 单倍型 Haplotype | 单倍型多态性 Haplotype diversity（h） | 核苷酸多态性 Nucleotide diversity（pi） |
|---|---|---|---|---|
| E | | | 0.984 | 0.00861 |
| E1 | GTGCAACGGT CTAACCACAT AATCTTGT | H1 | | |
| E2 | .C....T... ......G... G....C.. | H2 | | |
| E3 | ACA....... ......G... G....C.. | H3 | | |
| E4 | .C........ ......G... G....CTC | H4 | | |
| E5 | .CA....A.. ......G... G..T.C.. | ***H5*** | | |
| R | | | 0.991 | 0.00974 |
| R1 | .C......A. ......G... ..A...TC | H6 | | |
| R2 | AC.......C .......... .....C.. | H7 | | |
| R3 | .C...G.... ..T...G.G. ..C..C.. | H8 | | |
| R4 | AC........ ......G... .....CTC | H9 | | |
| R5 | .C........ ......G... .....C.. | ***H10*** | | |
| R6 | .CA....... T.....G... .....C.. | H11 | | |
| X | | | 0.969 | 0.00849 |
| X1 | .C........ ....AT.T.. G..T.C.. | H12 | | |
| X2 | ACA....... ......G..C .....C.. | H13 | | |
| X3 | .C........ ...G..G... .G...C.. | H14 | | |
| X4 | .CA.....A. ......G... G....C.. | H15 | | |
| X5 | .CA....... ......G... G....C.. | H16 | | |
| X6 | .C........ ......G... .....C.. | ***H10*** | | |
| N | | | 0.984 | 0.01011 |
| N1 | .C........ ......G... .....CTC | H17 | | |
| N2 | .C.T...... T.....G... G...CC.. | H18 | | |
| N3 | AC.......C ......G... G....C.. | H19 | | |
| N4 | .CA....A.. ......G... G..T.C.. | ***H5*** | | |
| N5 | .CA.....A. .....TG... G....C.. | H20 | | |
| Y | | | 0.965 | 0.00824 |
| Y1 | .CA....... ......G... G....CT. | H21 | | |
| Y2 | AC..C..... ......GT.. G..T.C.. | H22 | | |
| Y3 | .C........ T......... G....C.. | H23 | | |
| Y4 | .CA....A.. ......G... G..T.C.. | ***H5*** | | |
| Y5 | .C........ ......G... .....C.. | ***H10*** | | |

注 Note：H 表示单倍型，“***H***”代表共享的单倍型 H stands for haplotype；“***H***”stands for shared haplotype.

### 2.3 种群间的遗传结构

在表 4 中对 5 个桔小实蝇地理种群间的 Fst 值和基因流进行了计算。5 个地理种群间的 Fst 值为 0.0364 ~ 0.1482（$P > 0.05$），说明几个地理种群间的遗传分化程度不高。

表 4 桔小实蝇 5 个地理种群的 Fst 值和基因流

Table 4 The Fst value and genetic flow among 5 geographic populations of *B. Dorsalis* from Yunnan Province

| | R | X | N | Y | E |
|---|---|---|---|---|---|
| R | — | 9.950 | 13.25 | 4.800 | 9.190 |
| X | 0.0478 | — | 6.770 | 6.700 | 7.610 |
| N | 0.0364 | 0.0797 | — | 4.220 | 4.170 |
| Y | 0.0943 | 0.0807 | 0.1343 | — | 3.880 |
| E | 0.0516 | 0.0703 | 0.1364 | 0.1482 | — |

注 Notes：对角线以上为群体间的 Nm 值，对角线以下为群体间的 Fst 值 The data above the diagonal are Nm; the data below the diagonal are Fst.

不同地理种群间的基因流（gene flow）用 Nm 值表示，通常 Nm > 4 表明种群间的基因交流比较充分，若 Nm < 1 则表明种群可能由于遗传漂变而发生了分化（Allendorf, 1983）。本研究中 5 个地理种群间的 Nm 值在 3.88 ~ 13.25 之间，表明各地理种群间都存在着一定程度的基因交流，这也反映了桔小实蝇 5 个种群间存在的遗传分化程度还比较低。

### 2.4 桔小实蝇云南种群与其对照种间的遗传关系

计算了桔小实蝇云南种群与其对照种间的净遗传距离。桔小实蝇 3 个国外个体间的遗传距离为 0.434 ~ 1.714（GonBank 序列号 AY053507、AY053510、AY053512），不同实蝇种类间的遗传距离为 11.500 ~ 18.436。云南省桔小实蝇 5 个地理群体间的遗传距离 0.040 ~ 0.146，远远小于不同种实蝇间的遗传距离，而与国外的桔小实蝇种群间的遗传距离接近，这表明云南桔小实蝇 5 个地理种群间的遗传差异仅限群体自身，发生遗传分化的程度比较低。

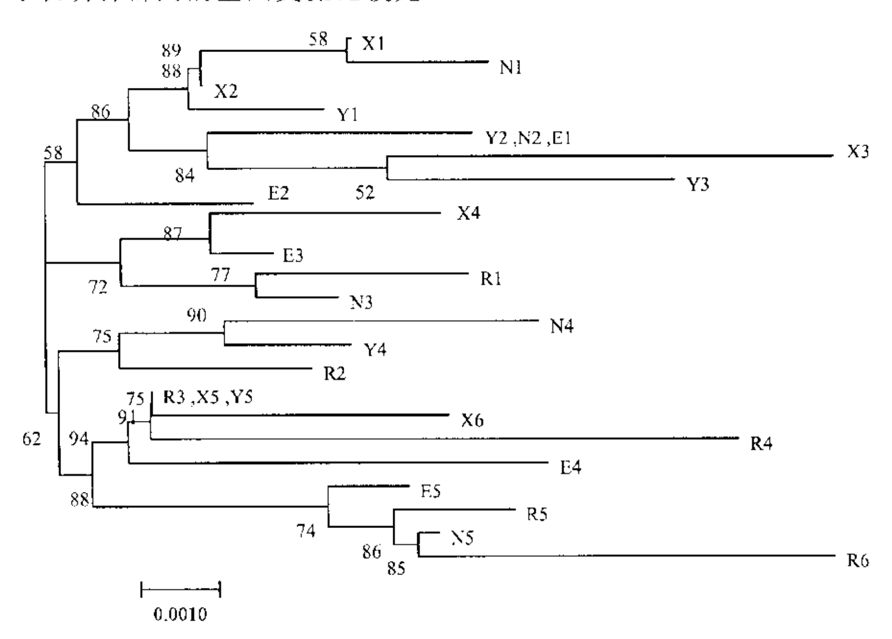



图 1 用 N-J 法构建的桔小实蝇 23 种单倍型的分子系统树（枝上的数字为置信度）

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree of 23 haplotypes was constructed by N-J method (Numbers indicate bootstrap confidence values)

## 3 讨论

本研究基于对 mtDNA COⅠ基因部分序列的测序和分析，初步探讨了云南桔小实蝇 5 个地理种群间的遗传关系，研究结果表明 5 个地理种群间已存在一定程度的遗传分化，但分化的程度还比较低。

作者认为云南桔小实蝇 5 个地理种群间存在的遗传分化主要是受地理因素的影响。云南的地势西北高东南低，一些高山大河、沟谷深壑呈南北走向相间排列（晁维明，1987），山体、水域等天然屏障在地理隔离中有重要的作用（Su *et al.*, 2001）。本次研究中所选择的 5 个桔小实蝇发生地位于云南北纬 24°以南从东到西近 400 km 的范围内，被南北走向的山脉、河流分隔开来。例如，瑞丽与景洪之间有高黎贡山、怒江、澜沧江等山脉、河流的隔离，在景洪与河口、元江之间有哀牢山、无量山等山脉的分隔，这些南北走向的大山大河从客观上构成了 5 个桔小实

蝇种群东西向活动难以逾越的地理屏障。桔小实蝇具有一定的飞翔能力，持续飞翔距离最长可达 65 km（Fletcher，1987），但仍难以凭借自身力量克服这些屏障的阻隔。因此，这些地区的桔小实蝇实际上是被分隔在相对隔绝的区域中，各种群相互之间进行基因交流的机会减少，遗传分化也随之逐渐产生。所以，地理隔离是导致云南桔小实蝇5个种群遗传分化的根本原因。

通过分析认为5个地理种群间遗传分化程度比较低的原因，一方面可能与我们推测该虫在云南发展的历史较短有关。由于该虫在云南发展的时间相对较短，估计还不足以积累更多的遗传变异，各桔小实蝇种群仍然还保持着相对密切的遗传联系，故表现为遗传分化程度不高。

另一方面，这5个种群遗传分化的程度低也可能与各种群所在区域内的生态条件基本一致有关。群体的分化程度主要是对所在的生态条件相适应的结果，如果其所产生环境作用强度及方向大体相同，则各分布区内的种群在遗传上将难以形成显著的分化（Kelley，2000）。在本研究中，桔小实蝇的5个实验种群分别来自云南的瑞丽、景洪、元江、化念、河口，这5个地区的气候条件均属于热带气候，年均温在18°以上，冬季基本无霜雪，常年雨量充沛，海拔高度均在1 200 m以下，并且都分布于北纬24°以南的范围中。同时，这些地区也是芒果、番石榴等桔小实蝇主要寄主水果的主产区。5地的桔小实蝇种群所承受的生态环境影响大体相近，即气候条件与寄主种类基本相似，自然选择对各桔小实蝇种群的趋异进化作用不显著，因而，桔小实蝇5个地理种群间遗传分化的程度也相应较低。

通过对云南省北纬24°以南桔小实蝇5个地区内地理种群间遗传关系的初步探讨，其结果从一定程度上反映了该虫在云南不同地理种群间的遗传差异。为了能更加全面地掌握云南桔小实蝇分布区内各地理种群空间分布规律的内在联系，作者将在下一步的研究中，将进而探讨云南南北方向（不同纬度）分布的地区中桔小实蝇种群间的遗传关系，同时增加研究样品的数量和所选分子标记COⅠ基因的测序长度，以期得到更多的遗传信息，为云南桔小实蝇的区域性控制提供更为全面的分子生物学数据。

**致谢** 承蒙中国科学院动物研究所汪兴鉴研究员鉴定实蝇标本，并对本文文稿的修改提出了宝贵的意见；云南大学的张智英教授在采样工作中给予了许多帮助，谨此一并表示衷心地感谢！

## 参考文献 （References）

Allendorf FW，1983. Gene flow and genetic differentiation among populations. *Genetics and Conservation*，18(3)：51－65.

Chao WM，1987. Soil Resources in Yunnan. Kunming: Yunnan Scientech Press. 78 pp.［晁维明，1987. 云南国土资源. 昆明：云南科技出版社. 78页］

Cheng JA，Tang ZH，2001. Insect Molecular Science. Beijing: Science Press. 7－14.［程家安，唐振华，2001. 昆虫分子科学. 北京：科学出版社. 7－14］

Christenson LD，Foot RH，1960. Biology of fruit flies. *Ann. Rev. Entomol.*，5(2)：171－192.

Fletcher BS，1987. The biology of *Dacine* fruit flies. *Ann. Rev. Entomol.*，32(11)：115－144.

Haymer D，McInnis D，1994. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly，*Ceratitis capitata*，at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome*，37(10)：244－248.

Kambhampati S，Rai KS，1991. Mitochondrial DNA variation within and among population of the mosquito *Aedesalbopictus*. *Genome*，34(8)：288－292.

Kelley ST，Farrell BD，Mitton JB，2000. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. *Heredity*，84(14)：218－272.

Kumar S，Tamura K，Jakobsen IB，Nei M，2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*，17(12)：1 244－1 245.

Li HX，Ye H，Lu J，2000. On damages and distributions of fruit fly (*Bactrocera dorsalis* Hendel) in Yunnan province，Southern China. *Journal of Yunnan University*，22(6)：473－475.［李红旭，叶辉，吕军，2000. 桔小实蝇在云南的危害分布. 云南大学学报，22(6)：473－475］

Muraji M，Nakahara S，2001. Phylogenetic relationships among fruit flies *Bactrocera* based on the mitochondrial rDNA sequence. *Insect Molecular Biology*，10(6)：549－559.

Southwood TRE，Comins HN，1976. A synoptic population model. *Journal of Animal Ecology*，45(19)：949.

Su B，Fu YX，Wang YX，Jin L，Chakraborty R，2001. Genetic diversity and population history of the red panda as inferred from mitochondrial DNA sequence variations. *Mol. Biol. Evol.*，18(6)：70－76.

（责任编辑：袁德成）